

(1)

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-153966

(43)公開日 平成6年(1994)6月3日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/57	Z N A			
C 0 7 K 13/00		8517-4II		
C 1 2 N 1/21		7236-4B		
		8931-4B	C 1 2 N 15/ 00	A
		9281-4B	5/ 00	B
審査請求 未請求 請求項の数7(全 12 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号	特願平4-312242	(71)出願人	000005968 三菱化成株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号
(22)出願日	平成4年(1992)11月20日	(72)発明者	下村 猛 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三 菱化成株式会社総合研究所内
		(72)発明者	山田 和徳 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三 菱化成株式会社総合研究所内
		(72)発明者	森本 裕紀 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三 菱化成株式会社総合研究所内
		(74)代理人	弁理士 長谷川 曉司 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規なタンパク質およびそれをコードする遺伝子

(57)【要約】

【構成】 1本鎖の肝実質細胞増殖因子(HGF)を活性型の2本鎖HGFに変換させる活性を持つヒト血清由来のプロテアーゼをコードする遺伝子をクローニングして、そのDNA配列を決定し、また同タンパク質のアミノ酸配列を推定した。バクテリアにより形質転換された同遺伝子を含む大腸菌およびCHO細胞中に同タンパク質を産生させた。

【効果】 上記遺伝子を導入した形質転換体を培養して得られる培養液から該タンパク質を容易に、大量かつ安定して得られる。

DNAX (クイックスタート) で PCR を行い、得られた配列表の配列番号 2 に記載の DNAX 断片を作成してマローブと組み立て、主として参照 DNA 塩基配列の 5' 塩基配列より 100 bp 以内の領域を決定した。決定した塩基配列を、

【0009】さらに上記のスクリーニング陽性のコロニーから、T. Maniatisらの方法（「モレキュラー クローニング」，コールド スプリング ハーバー ラボラトリー，85（1982））によりDNAを調製し、適当な制限酵素、例えばBamHI等で切断後、pUC18等のプラスミドにクローニングし、Sangerらのジデオキシル法（ブローディーニングス オブ ナジショナル アカデミーサイエンス コミュニケーションズ [Proc. Natl. Acad. Sci. USA]，74，5463（1977））によって目的とするDNA断片の塩基配列を決定することができる。

【0010】このようにして決定されるDNA断片の塩基配列（例えば、配列表の配列番号2に記載の塩基配列を部分配列として含むもの、配列表の配列番号3に記載の塩基配列で表されるもの）は、配列表の配列番号1に示す本発明タンパク質をコードしている。また本発明のかかるDNA断片としては、1本鎖型HGFを2本鎖型HGFに変換するプロテアーゼ活性を損なわない範囲で、一部の塩基を除去、置換、修飾または追加する等の改変を行ったものも含まれる。

【0011】上記のようにして得られるDNA断片は、その5'末端を修飾して常法に従って発現ベクターのプロモーターの下流に挿入され、大腸菌、枯草菌、酵母、動物細胞宿主等の細胞内に導入される。次に本発明タンパク質の産生方法につき詳細に説明する。発現ベクターとしては、上記のようにして得られた本発明タンパク質をコードするDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが好適に使用される。例えば大腸菌、枯草菌等の微生物を宿主とするときには、発現ベクターはプロモーター、リボゾーム結合(SD)配列、当該タンパク質遺伝子、転写終結配列およびプロモーターを制御する遺伝子よりなることが好ましい。

【0012】プロモーターとしては、大腸菌、*マウス*等由来のもの、例えばトリプトファン合成酵素 (*trp* P)、ラクトースオペロン (*lac* P)、*シムダフェージ* P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>、T<sub>7</sub> *マウス* P<sub>1</sub>が初期遺伝子でプロモーターである P<sub>35</sub>、P<sub>36</sub>プロモーター等が挙げられる。また、これらは例えば *pac* プロモーター (アグリカル・デュラ・ランド・バイオロジカル・ケミストリー [Agric. Biol. Chem.]、52、1983-1988 (1988)) のように独自に改変、設計された配列で

ラスミド上での配列順序としては、5'上流側からプロモーター、SD配列、当該タンパク質遺伝子、転写終結因子の順に並ぶことが望ましい。また、発現ベクター上のSD配列と当該タンパク質遺伝子とのユニットを複数個同方向に挿入することにより、ベクター上の転写単位のコピー数を増加させる方法（特開平1-95798号公報）を用いることもできる。

【0015】発現ベクターとして使用できるものとしては、pUA12（特開平1-95798号公報）、市販のpKK233-2（ファルマシア社製）等が挙げられる。また、融合蛋白として発現させる発現ベクターpGEXシリーズ（ファルマシア社製）等も同様に使用することかできる。宿主細胞の形質転換法としては、常法に従い行うことができる。

【0016】形質転換体の培養は、モレキュラー クローニング(コールド スプリングハーバー ラボラトリー, 1982年)に記載の方法に準じて行うことができる。上記したように、宿主細胞としては大腸菌、枯草菌、酵母等の微生物を使用することができるが、本発明タンパク質が多くのシステイン残基を含み、そのシステイン残基間のチオール結合の位置およびタンパク質の高次構造が活性の維持に影響を与える可能性があることを考慮すると、動物細胞、例えばCHO細胞、COS細胞、マウスL細胞、マウスC127細胞、マウスFM3A細胞等を用いて当該タンパク質遺伝子を発現させることが望ましい。

【0017】動物細胞のプロモーターとしては種々のものか報告されているが、例えばSV40プロモーター、メタロチオネイン遺伝子のプロモーター等を用いることができる。このプロモーターの下流に分泌シグナルおよび当該タンパク質遺伝子のDNA断片とを転写方向に従って挿入する。この場合、当該遺伝子のDNA断片を2〜3個結合したものを挿入してもよいし、また当該遺伝子のDNA断片のうち上流側にプロモーターを結合したDNA断片を単位とし、転写方向を揃えて2〜3個結合したものを挿入してもよい。

【0018】上記当該タンパク質遺伝子には、その下流にポリアダニル化部位が存在することが望ましい。例えばSV40 DNA、*B*-グロブリン遺伝子、メカロチオネイン遺伝子等由来のポリアダニル化部位を当該タンパク質遺伝子の下流に1つ存在させる。また、当該タンパク質遺伝子にプロモーターを含んだDNA断片を2〜3

[illegible]

【例 1-1-1】 某企业 2013 年 12 月 31 日资产负债表有关项目如下表所示。

[illegible]



処理したガラスフィルターに添加し、Applied Biosystems社製\$470Aシーケンサーでエドマン分解し、アミノ酸配列を決定した。フェニルチオヒダントイン(PTH)アミノ酸の同定は、三菱化成社製のMIC gel ODS I H U (0.46×1.5cm)カラムを用い、酢酸緩衝液(10mM酢酸緩衝液、pH4.7、0.01%SDSおよび3.8%アセトニトリル)による単一溶媒溶出を流速1.2mL/分、温度43℃で行い、PTHアミノ酸の検出は269nmの吸光度で行った。これらの条件下のうちの2つのバッチのアミノ酸配列を、配列表の配列番号6および7に示す。

実施例2 PCR法による本発明タンパク質の部分DNA断片の調製

基質DNAは市販のヒト肝臓cDNAバンク(クイッククローン<sup>TM</sup> ヒューマンリバーcDNA、クローンテック社製)を用いた。PCRは、パーキン・エルマー・シータスDNAサーマルサイクラー(Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler)を使用して、シーケンシングキット(Gene Amp DNA Amplification Reagent Kit、宝酒造製)を使って行った。基質DNA(1ng相当量)、10倍濃度の反応緩衝液(500mMKCl、100mMトリス塩酸バッファー(pH8.3)、15mMMgCl<sub>2</sub>および0.1%(w/v)セラチン)10μlおよびそれぞれ10mMのdGTP、dATP、dCTP、dTTPを2μlずつ、プライマー#1として配列表の配列番号4に記載の4鎖DNAプライマーおよびプライマー#2として配列表の配列番号5に記載の4鎖DNAプライマーをそれぞれ1種類(1配列)のプライマーが0.1μMになるようにして、Taq DNAポリメラーゼ0.5μlを加えて、滅菌脱イオン水で100μlの容積とする。反応は94℃、10分間の前処理後、94℃で1分間(変性ステップ)、37℃で2分間(延伸ステップ)および72℃で3分間(伸長ステップ)のインキュベーションを30サイクル行った。最後に72℃で7分間のインキュベーションを行い、反応を終了した。

【0027】得られた反応液をフェノール:クロロホルム(1:1)で抽出し、エタノール沈澱を行った。この沈澱を21.5μlの滅菌脱イオン水に溶解した後、10

amHI部位に挿入した後、常法に従って塩基配列を決定した。決定したPCRフラグメントの塩基配列を、配列表の配列番号2に示す。

実施例3 本発明タンパク質をコードする完全長DNA断片を含むクローンのスクリーニング

上記実施例2で作製した323bpのPCR断片をモレキュラー・クローニング(コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー、1982年)に記載の方法に従い、3P標識することによりスクリーニング用プローブとした。スクリーニング用のライブラリーとしては、ブライト・ラムダ・ファージ・ライブラリー(ストラテジーン社製)49才男性由来ヒト肝臓cDNAライブラリーを用いた。大腸菌はXL1-Blue(ストラテジーン社製)を用い、約500万バクテリオンとなるように上記のファージを感染させ、NZY培地で1晩生育させた後、デュボン社製のシー・スクリーン・プラスにトランスファーさせた。そのメンブレンを0.1M水酸化ナトリウム-0.5M塩化ナトリウムが染み込んだろ紙上に2分間静置し、続いて1.5M塩化ナトリウム-0.5Mトリス塩酸バッファー(pH7.5)が染み込んだろ紙上で5分間静置した。このフィルターの処理を更に2回繰り返した後、2×SSC(2倍SSC)でフィルターを洗浄し、乾いたろ紙上で風乾した。次にこのメンブレンに120mJ/cm<sup>2</sup>のUV照射を行うことにより、メンブレンに移したDNAの固定を行った。

【0029】こうして処理したメンブレン5枚を、50mMトリス塩酸バッファー(pH7.5)、1M塩化ナトリウムおよび1%SDSよりなる溶液50mlに浸漬し、65℃で2時間保持した。次に上記のP標識プローブ5ng/ml、鮭精子DNA100μg/ml、50mMトリス塩酸バッファー(pH7.5)、1M塩化ナトリウムおよび1%SDSよりなる溶液40mlに浸漬し、65℃で16時間保持した。その後メンブレンを取り出し、2×SSCで室温5分間、0.1×SSCで室温30分間2回の順に洗浄した後、常法に従ってオートラジオグラフィを行い、10ライブラリー40個を得た。

実施例4 DNA断片のサブクローニングおよび塩基配列の決定

実施例3で得られたポジティブのファージクローンより、エキシジョン(excision)法により直接プラスミドに1つのシングルクローンより500μlのS

【0030】得られた反応液をフェノール:クロロホルム(1:1)で抽出し、エタノール沈澱を行った。この沈澱を21.5μlの滅菌脱イオン水に溶解した後、10

【0031】得られた反応液をフェノール:クロロホルム(1:1)で抽出し、エタノール沈澱を行った。この沈澱を21.5μlの滅菌脱イオン水に溶解した後、10

【0032】得られた反応液をフェノール:クロロホルム(1:1)で抽出し、エタノール沈澱を行った。この沈澱を21.5μlの滅菌脱イオン水に溶解した後、10

4000gで5分間遠心分離し、上清を得た。上清の100倍希釈液20 $\mu$ lをXL1-Blue 200 $\mu$ lと混ぜ、37℃で15分間処理した後、その内2 $\mu$ lをアンピシリン40 $\mu$ g/mlを含むLB寒天培地に播いた。出現してきたコロニーのうち24個のプラスミドを取得、解析し、最も長い挿入断片を持つクローン(pBHGFP)につき塩基配列を決定した。決定した塩基配列を、配列表の配列番号3に示す。この塩基配列をもとに本発明のタンパク質のアミノ酸配列(配列表の配列番号1)を決定した。

#### 実施例5 発現プラスミドの調製

図1に、本発明タンパク質発現プラスミドの調製方法を示す。

【0030】実施例3で得られたプラスミド(pBHGFAP)を基質DNAとした。PCRは、パーキンエルマー ジーナス DNA サーマル サイクルー (Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler) を使用して、ジーン アンプレキット (Gene Amp DNA Amplification Reagent Kit、宝酒造製) を使って行った。基質DNA1 $\mu$ l (0.5 $\mu$ g相当量)、10倍濃度の反応緩衝液 (500mMKCl、100mMトリス塩酸バッファー (pH8.3)、15mMMgCl<sub>2</sub>および0.1% (w/v) ゼラチン) 10 $\mu$ lおよび1.25mMの4dNTPをそれぞれ16 $\mu$ lずつ、20 $\mu$ Mのプライマー#3 (一鎖DNAプライマー: 配列表の配列番号8) およびプライマー#4 (一鎖DNAプライマー: 配列表の配列番号9) を各5 $\mu$ l、Taq DNAポリメラーゼ0.5 $\mu$ lを加えて、滅菌脱イオン水で100 $\mu$ lの系とする。反応は94℃、10分間の前処理後、94℃で1分間 (変性ステップ)、52℃で1.5分間 (アニーリングステップ) および72℃で2分間 (伸長ステップ) のサイクルを22サイクル行った。最後に72℃で7分間のインキューションを行い、反応を終了した。得られた反応液をフェノール:クロロホルム=1:1で抽出し、エタノール沈澱を行った。この沈澱を16 $\mu$ lの滅菌脱イオン水に溶解した後、5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、862bpのバンドを常法に従って切り出してDNAフラグメントを回収し、エタノール沈澱を行った。

【0031】このようにして得られたDNA断片を常法

ールに従った。このようにして得られた組換え体から常法によりミニスクリーニングを行い、目的とする926bpのインサートを有するプラスミドpSHGFAPを得た。次にpSHGFAP 8 $\mu$ gを制限酵素BamHIおよびXhoIで切断し、フェノール/クロロホルム処理、エタノール沈澱を行った。この沈澱を16 $\mu$ lの滅菌脱イオン水に溶解した後、5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行って920bpのバンドを常法に従って切り出してDNAフラグメントを回収し、エタノール沈澱を行った。このようにして得られたDNA10ngと、あらかじめ制限酵素BamHIおよびXhoIで切断し、アルカリフォスファターゼ処理したpcDNA1/Neoプラスミド5ngをライゲーションキットを用いてライゲーションし、大腸菌DH5を形質転換させた。コンピカントセルはコンピカントハイを用い、添付のプロトコールに従った。このようにして得られた組換え体から常法によりミニスクリーニングを行い、目的のプラスミドpNSHGFAPを得た。

#### 実施例6 本発明タンパク質の大腸菌による発現

実施例5で作製されたプラスミドpSHGFAPを保持する大腸菌を、10mlのLB (50 $\mu$ g/mlのアンピシリン含有) 培地に接種して37℃で一晩 (12~16時間) 培養し、この培養液を10mlのLB (50 $\mu$ g/mlのアンピシリン含有) 培地に1/100量 (0.1ml) 加えて37℃で2時間培養した後、ペクター上に存在するlacプロモーターの転写誘導剤であるインプロピル  $\beta$ -Dチオガラクトシド (IPTG) を終濃度が1mMになるように添加し、さらに37℃で6時間培養した。培養液1mlから菌体を遠心分離により集め、この菌体中で発現された当該タンパク質を常法に従いウエスタンブロッティング法により検出を試みたところ、確かに発現されていることが明らかになった。これに対してIPTG無添加の場合、あるいは上記発現プラスミドpSHGFAPを含まない大腸菌株を用いた場合には、発現が確認されなかった。

#### 実施例7 本発明タンパク質を細胞的に発現する動物細胞株の取得

実施例5で作製された発現ペクターpcDNA1/Neoの制限酵素切断部位に当該タンパク質cDNAが挿入されたプラスミドpNHGFAPを、Maniatisらの方法 ("モリキュラー クローニング", コールド

Springer, Inc. 1982) に従って、大腸菌から抽出したプラスミドpUC18 (20ng) とを混合し、ライゲーションキット (宝酒造製) を用いてライゲーションを行った。このようにして得られた組換え

プラスミドpNHGFAPを、Maniatisらの方法 ("モリキュラー クローニング", コールドSpringer, Inc. 1982) に従って、大腸菌から抽出したプラスミドpUC18 (20ng) とを混合し、ライゲーション

blishing Associates and Wiley-InterScience], 9・1・1章-9・1・4章(1987))を基にCHO細胞を形質転換した。即ち、まず直径9cmのシャーレの中で、FBS(牛胎児血清)が10%入ったERDF培地(極東製薬社製)中でCHO細胞をセミコンフルエントな状態になるまで培養した。次にシャーレから培地を除き、そこにDNA溶液を滴加するが、該DNA溶液は予め以下の手順に従って調製した。まず直径9cmのシャーレ一枚につき300 $\mu$ lの2 $\times$ HEBS溶液(1.6%塩化ナトリウム、0.074%塩化カリウム、0.05%リン酸水素二ナトリウム12水塩、0.2%デキストロスおよび1%HEPES(pH7.05))および10 $\mu$ gのプラスミドDNAを加え、滅菌された水で570 $\mu$ lに合わせた溶液をエッペンデルフ遠心管中に準備する。次に該DNA溶液に、30 $\mu$ lの2.5M塩化カルシウム溶液を滴加しながらボルテックスミキサーを用い数秒間激しく混和する。これを室温で30分間放置する。

【0033】このようにしてできたDNA溶液を前述の細胞にかけて、室温で30分間静置した。その後FBSが10%入ったERDF培地9mlをシャーレに入れて、5%CO<sub>2</sub>存在下、37℃で4~5時間培養した。次にシャーレから培地を除き、5mlの1 $\times$ TBS++溶液(25mMトリス塩酸ブッファー(pH7.5)、140mM塩化ナトリウム、5mM塩化カリウム、0.6mMリン酸水素二ナトリウム、0.08mM塩化カルシウムおよび0.08mM塩化マグネシウム)で細胞を洗浄し、1 $\times$ TBS++溶液を除去した後、グリセロールを20%含む1 $\times$ TBS++溶液5mlを細胞にかけて室温で1~2分間静置し、上清を除去した。その後5mlの1 $\times$ TBS++溶液で細胞を再び洗浄し、FBSが10%入ったERDF培地10mlをシャーレに入れ

配列

Ala	Leu	Ser	Trp	Glu	Tyr	Cys	Arg	Leu	Glu	Ala	Cys	Glu	Ser	Leu	Thr
1				5						10				15	
Arg	Val	Gln	Leu	Ser	Pro	Asp	Leu	Leu	Ala	Thr	Leu	Pro	Glu	Pro	Ala
				20						25				30	
Ser	Pro	Gly	Arg	Gln	Ala	Cys	Gly	Arg	Arg	His	Lys	Lys	Arg	Thr	Phe
				35						40				45	
Leu	Arg	Pro	Arg	Ile	Ile	Gly	Gly	Ser	Ser	Ser	Leu	Pro	Gly	Ser	His
				50				55						60	

80

90

95

Ser	Pro	Pro	Arg	Asp	Ser	Val	Ser	Val	Val	Leu	Gly	Gln	His	Phe	Phe
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

100

105

110

て5%CO<sub>2</sub>存在下、37℃で培養した。培養48時間が経過した時点で培地を除き、5mlの1 $\times$ TBS++溶液で細胞を洗浄した後、トリプシン処理を行って細胞をシャーレより剥かし、9cmシャーレ一枚分の細胞を9cmシャーレ10枚に分けて、薬剤G418(G413硫酸塩(GENETICIN)、GIBCO社製)を200 $\mu$ g/mlの濃度になるように加えて培養を続けた。その後10日経過した時点で生き残ったG418耐性の細胞を単離し、24ウェルプレートを用い、10%FBSを含むERDF培地1ml中で7日間培養した。その後血清を含まないERDF培地に代えて培養を続け、72時間後個々の培養液を集め、限外ろ過濃縮後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。これを常法に従ってウェスタンブロッティングを行い、当該タンパク質の発現を確認した。

【0034】

【発明の効果】本発明により、1本鎖HGFを活性型の2本鎖HGFに変換するプロテアーゼ活性を有するポリペプチドをコードする新規なDNA断片が得られ、その塩基配列が明らかにされた。その当該タンパク質遺伝子を挿入された発現ベクターを宿主細胞に導入することにより、当該タンパク質を大量、安定、かつ容易に生産することが可能になると考えられる。

【0035】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：300

配列の型：アミノ酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

生物名：ヒト

13 14  
 Pro Tyr Thr Leu Tyr Ser Val Phe Asn Pro Ser Asp His Asp Leu Val  
 130 135 140  
 Leu Ile Arg Leu Lys Lys Lys Gly Asp Arg Cys Ala Thr Arg Ser Gln  
 145 150 155 160  
 Phe Val Gln Pro Ile Cys Leu Pro Glu Pro Gly Ser Thr Phe Pro Ala  
 165 170 175  
 Gly His Lys Cys Gln Ile Ala Gly Trp Gly His Leu Asp Glu Asn Val  
 180 185 190  
 Ser Gly Tyr Ser Ser Ser Leu Arg Glu Ala Leu Val Pro Leu Val Ala  
 195 200 205  
 Asp His Lys Cys Ser Ser Pro Glu Val Tyr Gly Ala Asp Ile Ser Pro  
 210 215 220  
 Asn Met Leu Cys Ala Gly Tyr Phe Asp Cys Lys Ser Asp Ala Cys Gln  
 225 230 235 240  
 Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ala Cys Glu Lys Asn Gly Val Ala Tyr  
 245 250 255  
 Leu Tyr Gly Ile Ile Ser Trp Gly Asp Gly Cys Gly Arg Leu His Lys  
 260 265 270  
 Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Ala Asn Tyr Val Asp Trp Ile Asn Asp  
 275 280 285  
 Arg Ile Arg Pro Pro Arg Arg Leu Val Ala Pro Ser  
 290 295 300

【0036】配列番号：2

配列の長さ：329

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：ヒト

直接の起源：Quick-clone™ ヒト肝臓cDNA (Clontech社製)

## 配列

GGATCC CAG ATT GCG GGC TGG GGC CAC TTG GAT GAG AAC GTG AGC GGC 48  
 Gln Ile Ala Gly Trp Gly His Leu Asp Glu Asn Val Ser Gly  
 1 5 10  
 TAC TCC AGC TCC CTG CGG GAG GCC CTG GTC CCC CTG GTC GCC GAC CAC 96  
 Tyr Ser Ser Ser Leu Arg Glu Ala Leu Val Pro Leu Val Ala Asp His  
 15 20 25 30  
 AAG TGC AGC AGC CCT GAG GTC TAC GGC GCG GAC ATC AGC CCC AAC ATG 144  
 Lys Cys Ser Ser Pro Glu Val Tyr Gly Ala Asp Ile Ser Pro Asn Met  
 35 40 45  
 CTC TGT GCC GGC TAC TTC GAC TGC AAG TCC GAC GCC TGC CAG GGG GAC 192  
 Leu Cys Ala Gly Tyr Phe Asp Cys Lys Ser Asp Ala Cys Gln Gly Asp  
 50 55 60  
 TCA GGG GGG CCC CTG GCC TGC GAG AAG AAC GGC GTG GCT TAC CTC TAC 240  
 Phe Val Pro Leu Ala Cys Gln Lys Asn Gly Val Ala Tyr Leu Tyr  
 80 85 90  
 GTC TAC ACC CGC GCG GCC AAC TAT GTG GAC TGG AT GGA TCC 329  
 Val Asn Thr Val Met Asn Tyr Val Asp Trp



配列の型：核酸  
鎖の数：2本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：cDNA

起源  
生物名：ヒト  
直接の起源：Pre-made Lambda phage Library、ヒト肝臓（49才、男）cDNA Library（Stratagene社製）

## 配列

GCGCGCTCTC CTGGGAGTAC TGCCGCCTGG AGGCCTGCGA ATCCCTCACC AGAGTCCAAC 60  
TGTCACCGGA TCTCCTGGCG ACCCTGCCTG AGCCAGCCTC CCCGGGGCGC CAGGCCCTGCG 120  
GCAGGAGGCA CAAGAAGAGG ACGTTCCTGC GGCCACGTAT CATCGGGCGC TCCTCCTCGC 180  
TGCCCGGGTC GCACCCCTGG CTGGCCGCCA TCTACATCGG GGACAGCTTC TGCGCCGGGA 240  
GCCTGGTCCA CACCTGCTGG GTGGTGTCGG CCGCCCACTG CTTCTCCAC AGCCCCCCA 300  
GGGACAGCGT CTCGTGGTG CTGGCCAGC ACTCTTCAA CCGCACGACG GACGTGACGC 360  
AGACCTTCGG CATCGAGAAG TACATCCCGT ACACCTTGA CTCGGTGTTC AACCCGAGCG 420  
ACCACGACCT CGTCTGATC CGGTGAAGA AGAAAGGGGA CCGCTGTGCC ACACGCTCGC 480  
AGTTCGTGCA GCCCATCTGC CTGCCCGAGC CCGGCAGCAC CTTCCCGCA GGACACAAGT 540  
GCCAGATTGC GGGCTGGGGC CACTTGGATG AGAAGTGAG CCGCTACTCC AGCTCCCTGC 600  
GGGAGGCCCT GGTCCCTCTG GTGCCCGACC ACAAGTGAG CAGCCCTGAG GTCTACGGCG 660  
CCGACATCAG CCCAACATG CTCTGTGCCG GCTACTTGA CTGCAAGTCC GACGCTGCC 720  
AGGGGGACTC AGGGGGGCC CTGGCCTGCG AGAAGAACGG CGTGGCTTAC CTCTACGGCA 780  
TCATCAGCTG GGGTGACGGC TGGGGCGGC TCCACAAGCC GGGGGTCTAC ACCCGCGTGG 840  
CCAACATGT GGA CTGGATC AACGACCGGA TACGGCTTC CAGGCGGCTT GTGGCTCCCT 900  
CCTGACCCTC CAGCGGGACA CCCTGGTTCC CACCAATGCC TGCTTGTCTG ACAATAAAGA 960  
TATTTCCAAG 970

【0038】配列番号：4

配列の長さ：26  
配列の型：核酸  
トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

起源

生物名：ヒト

## 配列

CTCGGATCCC ARATNGCNGG NTGGGG

26

R : G or A, N : A, G, C or T

【0039】配列番号：5

配列の長さ：26  
配列の型：核酸  
トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

10 起源

生物名：ヒト

## 配列

CTCGGATCCA TCCTATCAGC RTARTT

26

R : G or A, N : A, G, C or T

【0040】配列番号：6

配列の長さ：7  
配列の型：アミノ酸  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：ペプチド

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間フラグメント

起源

生物名：ヒト

## 配列

## 配列

Cys Gln Ile Ala Gly Trp Gly

1

5

【0041】配列番号：7

配列の長さ：7  
配列の型：アミノ酸  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：ペプチド

配列の長さ：10

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

起源

17

18

生物名：ヒト

配列

GTCCAACTGT CACCGGATC

19

【0043】配列番号：9

配列の長さ：19

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

起源

生物名：ヒト

配列

CGCTCGAGGG TCAGGAGGG

19

【0044】配列番号：10

配列の長さ：71

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状：

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

起源

生物名：ヒト

配列

AATTCGGATC CATGAAGGTT CTGTGGGCTG CGTTGCTGGT CACATTCCTG GCAGGATGCC 60

GCCTAG GTACTTCCAA GACACCCGAC GCAACGACCA GTGTAAGGAC CGTCCTACGG

AGGCCAAGGT G

71

TCCGGTTCCA C

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明タンパク質発現プラスミドの調製方法を示した図である。図中、P<sub>lac</sub>は大腸菌lacプロモ-

10 ター、P<sub>α</sub>はサイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、A<sub>r</sub>はアンピシリン耐性遺伝子、N<sub>r</sub>はネオマイシン耐性遺伝子を表す。

○ ColE1 origin  
● SV40 origin  
◐ Polyoma origin

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:91)

(72)発明者 喜多村 直実  
大阪府守口市八雲東町2-82-21-910

(72)発明者 宮澤 恵二  
兵庫県芦屋市高浜町3-1-524